研究成果報告書 科学研究費助成事業

今和 5 年 6 月 1 5 日現在

機関番号: 12301

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2018~2022

課題番号: 18K11015

研究課題名(和文)大腸で産生される活性硫黄分子種・窒素種・酸素種間相互作用への食品成分の影響評価

研究課題名(英文)Effects of food materials on the interaction among reactive sulfur species, nitrogen species, and oxygen species in the large intestine.

研究代表者

輿石 一郎 (Koshiishi, Ichiro)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号:20170235

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文): 近年、タンパク質結合型硫化水素が細胞内の抗酸化系の主役を担っている可能性がクローズアップされた。一方、抹消組織の恒常性維持に腸内細菌が関与する可能性が数多く報告されている。これらの事象から、抹消組織でのタンパク質結合型硫化水素の由来として、その一部が腸内で産生される硫化水素由来である可能性を検証することが求められた。検討の結果、硫化水素と活性酸素種・活性窒素種との相互作用により多硫化水素が生成した後、腸粘膜上皮細胞あるいは血漿中成分と反応し、パースルフィドの形で血管内を循環すると考えられた。本課題研究では、パースルフィドの分析法を確立し、ヒトへの臨床試験に応用展開する ことを可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義 ヒトの寿命が百年時代を迎えるが、次の目標は「健康寿命百年時代」である。生体の老化は、数十年に亘る酸化 ストレス障害の積み重ねの結果であり、酸化ストレス障害の回避がこの目標にとって肝要である。抗酸化ストレ ス系として、サルフェン硫黄を中心とした活性硫黄分子種が主役を演じていることが明らかになり、食事を介し た抹消細胞での抗酸化機能の強化が可能になると考えられる。本研究課題の実施により、臨床試験の実施の準備 が整い、如何なる食事の習慣的な摂取が抹消組織のサルフェン硫黄濃度維持に寄与するのかを明らかにすること により、生体の老化を遅延させ「健康寿命百年時代」の達成の一助になることを期待する。

研究成果の概要(英文): Recently, the protein-bound hydrogen sulfide has gained attention as an active sulfur species and is believed to play a key role in the cellular antioxidant system. On the other hand, the involvement of intestinal bacteria in maintaining homeostasis in peripheral tissues has been extensively reported. Taken together these observations, it was necessary to investigate the possibility that a part of protein-bound hydrogen sulfide in peripheral tissues originates from hydrogen sulfide produced in the intestine. In the present study, it is postulated that hydrogen polysulfides are generated through interactions between hydrogen sulfide and reactive oxygen/nitrogen species. These polysulfides then react with the components in the intestinal mucosal epithelial cells or plasma, and circulate within blood vessels in the form of persulfides. In this research project, we established analytical methods for these persulfides, enabling their application in clinical trials on humans.

研究分野: 生物分析科学

キーワード: 活性硫黄分子種 命百年時代 活性酸素種 活性窒素種 サルフェン硫黄 パーサルファイド 腸内細菌叢 健康寿

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等に ついては、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1.研究開始当初の背景

直近の 10 年程の硫黄に関する研究は、細胞内におけるゼロ価の硫黄原子(サルフェン硫黄)を有する化合物が既知の生理機能の枠を超えて未知の生理機能を果たしている可能性を示唆している。その含量は、創造よりもかなりの高濃度で存在することが想定されている。グルコースや脂肪をエネルギー源とする細胞は、ミトコンドリア内膜の電子伝達系の複合体 I~III に複数の鉄イオウクラスターを有する。この鉄イオウクラスターの硫黄はミトコンドリアでシステインから産生されるサルフェン硫黄である。しかしながら、細胞内には、鉄イオウクラスター産生に必要なサルフェン硫黄量よりもはるかに多い量のサルフェン硫黄の存在が予想されている。このように高濃度に存在することが想定されるサルフェン硫黄が細胞内でシステインを基質として産生されると考えるのは無理がある。そこで考えられているのが外因性のサルフェン硫黄の取り込みである。外因性サルフェン硫黄の取り込みとしては、 腸内細菌により産生される硫化水素由来サルフェン硫黄の取り込み、および 食品由来イオウ含有化合物の摂取が考えられる。しかしながら、サルフェン硫黄は極めて反応性に富むことから、消化管から生体内抹消細胞への送達には何かしらの送達系の存在が欠かせない。本課題研究では、特に血液中に存在する輸送形が外因性サルフェン硫黄由来であるとの仮定の下、その特定と検出系の確立を試みた。

2.研究の目的

腸内で硫酸還元菌により産生される硫化水素がサルフェン硫黄に変換されるためには、2電子酸化を受けなくてはならない。

$$H_2S$$
 $S^0 + 2e^- + 2H^+$

このサルフェン硫黄が硫化水素に付加した分子が、サルフェン硫黄供与体として機能する多硫化水素(H_2S_n)である。多硫化水素の生成機構としては、活性酸素種・活性窒素種を構成するラジカルと硫化水素との反応により生成するチイルラジカル(\bullet SH)がラジカル-ラジカル付加を起こす経路が考えられる。消化管で産生される活性酸素種としては、粘膜上皮細胞が恒常的に発現している NADPH オキシダーゼにより消化管内腔側で産生されるスーパーオキシドアニオンラジカル(\bullet O₂)が挙げられる。また、活性窒素種としては、硝酸還元菌が硝酸をアンモニアに変換する過程で産生される一酸化窒素ラジカルおよび炎症刺激下の粘膜上皮細胞が発現する誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)により産生される一酸化窒素が挙げられる。硫化水素と活性酸素種・活性窒素種との反応により生成する多硫化水素は、粘膜上皮細胞内に取り込まれた場合、細胞内にmM オーダーで存在するグルタチオン(G-SH)にサルフェン硫黄を転移し、グルタチオンハイドロ

パースルフィド(G-SSH)ならびにグルタチオンパースルフィド(G-SSH)ならびにグルタチオンパースルフィド(G-SSS-G)を生成する(図1)。これらの産物は、排出タンパク質により基底膜側に排出され血流に乗る。ただし、これらグルタチオン由来パースルフィドは -グルタミルトランスペプチダーゼおよびジペプチダーゼによりシステインパースルフィドおよびシステインパースルフィドおよびシステインパースルフィドで変換されると予想される。一方、粘膜上皮細胞間隙を透過して体内に取り込まれた多にして変換されるとがある。漿液中には、およそ400ルフェン硫黄を転移する。漿液中には、およそ400ルフェン硫黄を転移する。りなることがら、反応産物としてアルブミンの34位のシステイン残基にサルフェン硫黄が付加したアルブミンハイドロパースルフィドが生成すると考えられる。

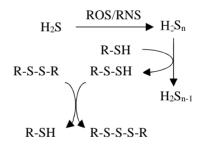


図 1 硫化水素由来サルフェン硫黄 の生体内挙動

さらに、植物由来食品中にはイオウ含有化合物が存在する。特に、二ン二クにはジアリルトリスルフィド(CH₂=CH-CH₂-S-S-S-CH₂-CH=CH₂)が、キャベツ、ブロッコリー、ネギにはジメチルトリスルフィド(CH₃-S-S-S-CH₃)が含まれ、これらはサルフェン硫黄供与体として機能する。また、これらは血液サラサラ成分としての生物活性が報告されている。

消化管から抹消組織へのサルフェン硫黄の供給の可能性を明らかにするには、血液中に存在するこれらハイドロパースルフィドならびにパースルフィドを測定する手法を開発することが欠かせない。測定法の確立により、腸内バランスならびに食餌を介したサルフェン硫黄供与体の摂取が抹消組織の細胞内サルフェン硫黄の動態に及ぼす影響を解明することが可能となる。

3.研究の方法

消化管で生成した硫化水素がサルフェン硫黄に変換される初段反応は、多硫化水素の生成である。多硫化水素は生体内物質と極めて反応性に富むことから、その定量のためには安定化させなくてはならない。多硫化水素は2分子のアルキル化剤と反応し安定化する。本研究では、アルキル化剤として、その反応速度が比較的早く、細胞膜を容易に透過するヨードアセトアミドを用

いてアルキル化することとした。ヨードアセトアミドで安定化した反応生成物を電気化学検出器を検出計とする高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で高感度分析することとした。

多硫化水素とグルタチオンとの反応で生成するグルタチオンハイドロパースルフィドもまた 反応性に富むことから、ヨードアセトアミドによりアルキル化し、グルタチオンとメルカプトア セトアミドの混合型ジスルフィドを生成させた後、オルトフタルアルデヒドを発蛍光試薬とす るポストカラム誘導体化 HPLC で測定することとした。

アルブミンの 34 位システインにサルフェン硫黄が転移して形成されたハイドロパースルフィドは、ヨードアセトアミドでアルキル化後、還元剤で還元し、遊離するメルカプトアセトアミドをスルフヒドリル基に特異的な蛍光ラベル化剤で蛍光標識して分離検出するプレカラム誘導体化蛍光検出 HPLC で測定することとした。

4. 研究成果

1) 多硫化水素の分析

S-AAm および AAm-S-S-S-AAm が検出され た。その定量的評価を行ったところ、二硫化ナト リウムの標準品を用いた際の AAm-S-AAm と AAm-S-S-S-AAm との生成量には相関がみられ た。この結果より、図2のような反応が起きてい ることが考えられた。硫化水素の標準液を用いて ヨードアセトアミドによりアルキル化すると、そ の反応産物は AAm-S-AAm であり多硫化水素由 来の反応産物は検出されない。よって、アルキル 化の反応中間体として生成するモノアルキル化 多硫化水素はハイドロパースルフィドであるこ とから極めて求核性反応に富み、多硫化水素を攻 撃することで、さらなるサルフェン硫黄の付加が 起こることが想定された。本検出法では、二硫化 水素および三硫化水素の分別定量は困難である が、多硫化水素の生成を明らかにすることは可能 である。

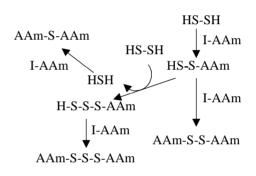


図 2 ヨードアセトアミドを用いた 二硫化水素のアルキル化反応

2) グルタチオンハイドロパースルフィドの分析

多くの研究者が多硫化水素の生物活性を明らかにするために、培養細胞の培地中に多硫化水素を添加している。このことから、多硫化水素は細胞膜透過性であると考えられる。細胞内に透過した多硫化水素は、細胞内に mM オーダーで存在するグルタチオンと速やかに反応し、グルタチオンハイドロパースルフィドを形成する。グルタチオンハイドロパースルフィド(G-S-SH)を分析するために、ヨードアセトアミドでアルキル化後、生成するグルタチオン・メルカプトアセトアミド混合ジスルフィド(G-S-S-AAm)を高感度定量することとした。報告者らは、グル

タチオン含有ジスルフィドがアルカリ性溶液中オルトフタルアルデヒドと加温することで 蛍光性反応産物が生成することを明らかにしている。この反応をポストカラム誘導体化反応とする HPLC で生成するグルタチオン・メルカプトアセトアミド混合ジスルフィドを 定量したところ、高感度定量することができた(図3)。

この十年ほどの間に活性硫黄分子種に関するいくつかのトピックスが報告されている。なかでも、細胞内にグルタチオンハイドロパースルフィドが数十から数百 μ M の濃度で存在するとの報告は世界のラジカル研究者を驚かせた。さらに、培養細胞においても比較

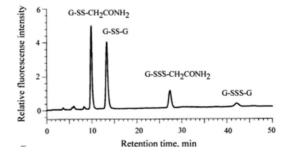


図3 グルタチオンと三硫化水素との反応産物の分析

的高濃度にグルタチオンハイドロパースルフィドが存在することが併せて報告されている。そ の測定法は、組織ホモジネートを弱アルカリ性下、蛍光性アルキル化剤であるモノブロモビマン で蛍光標識して LC-MS/MS で測定するものである。この操作で G-S-S-Bimane が生成している ことには疑う余地はないが、細胞中に恒常的に高濃度にグルタチオンハイドロパースルフィド が存在するのか否かについては疑問の余地が残る。報告者らは、培養細胞を生きた状態で細胞膜 透過性のヨードアセトアミドで処理し、細胞内で生成する G-S-S-AAm を上記の簡易高感度分析 法で測定してみたが、その存在量は検出限界以下であった。この結果より、報告者らは、細胞内 には報告された程の高濃度のグルタチオンハイドロパースルフィドは存在せず、弱アルカリ性 下モノブロモビマンとの反応中に生じるアーティファクトではないかと考えている。近年、高濃 度のグルタチオンハイドロパースルフィドが存在することを報告したグループは、トリスルフ ィド(R-S-S-S-R)がモノブロモビマンでの処理により分解することを報告しており、興味深い。 ここで、強調しておきたいのは、古くより細胞内には高濃度のタンパク質結合型の硫化水素が存 在し、ジチオスレイトールのような還元剤で処理することで硫化水素が高濃度に発生する事実 である。弱アルカリ性で還元性を発揮するグルタチオンが高濃度に存在する組織ホモジネート を弱アルカリ性下でインキュベートすることでグルタチオンハイドロパースルフィドが生成す る可能性が無いか、検討すべきと考えている。

3)サルフェン硫黄含有メルカプトアルブミンの測定

多硫化水素のサルフェン硫黄は、容易にスルフヒドリル基に転移する。血漿中には低分子のチオール化合物は微量であるが、およそ $400\,\mu\,\mathrm{M}$ 相当のメルカプトアルブミンが存在する。よって、血中に移行した多硫化水素はサルフェン硫黄をメルカプトアルブミンに供与し、アルブミンハイドロパースルフィドを産生することが予想される。このことから、アルブミンハイドロパースルフィドが測定対象となり得る。血中のアルブミンの半減期はおよそ 17 日であることから、血中に遊出するサルフェン硫黄供与体の検出に有効な測定対象である。

臨床研究への応用を考慮し、バイオハザード の観点から測定操作を遠心型限外ろ過装置を用 いることとした。ヨードアセトアミド処理した 血漿サンプルを限外ろ過装置(分子量カット、 30 kDa) に入れ、遠心処理し、高分子画分を膜 上に残した。 膜上の残渣を Tris(carboxyethyl)phosphine で還元処理し、メ ルカプトアセトアミドを遊離させる。さらに、 遠心分離処理を行い、タンパク質が除かれた沪 液中のメルカプトアセトアミドをチオール化合 物に特異的な蛍光標識剤である SBD-F で処理 し、生成する SBD-メルカプトアセトアミドを 蛍光検出 HPLC で分離検出した。本測定法によ り、血漿サンプル中に存在する数百 nM レベル のタンパク質中ハイドロパースルフィドが定量 可能である。ヨードアセトアミド未処理のヒト 血漿サンプル(対照サンプル)からは、SBDcysteine 、 SBD-homocysteine , glutathione が検出された。また、SBD-メルカ プトアセトアミド溶出位置にピークは観察され なかった。

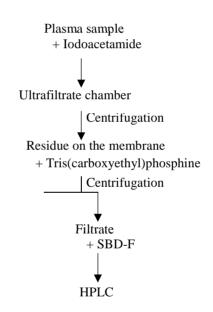


図4 血漿タンパク質中ハイドロパースルフィドの測定

4)まとめ

以上、消化管で、硫化水素と活性酸素種および活性窒素種との相互作用により生成した多硫化水素は、体内に吸収されるが、血中での主要な存在形は低分子のハイドロパースルフィドないしはパースルフィドであると考えられる。しかし、これらの低分子活性硫黄分子種は速やかに抹消細胞に取り込まれることからバイオマーカーとして相応しくない。一方、多硫化水素と血漿タンパク質(主にアルブミン)中スルフヒドリル基との反応により生成するハイドロパースルフィドは、アルブミンの血中半減期に相当する血中寿命を有するものと考えられる。このことから、血漿タンパク質中ハイドロパースルフィドがバイオマーカーとして相応しいと考えられる。今後の計画として、本法をヒトを対象とした臨床試験に応用し、食事摂取との関係、腸内細菌叢との関係、腸内炎症疾患との関係について検討していく計画である。

5 . 主な発表論文等

「雑誌論文 〕 計6件(うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件)

〔雑誌論文〕 計6件(うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件)	
1.著者名	4 . 巻
Yuta Takigawa, Seiya Nagai, Ichiro Koshiishi	46
2.論文標題	5 . 発行年
Isomerization of Oxidized Linoleate Metabolites with trans/cis Conjugated Diene Moiety to Those	2023年
with trans/trans One in the Lipoxygenase/Linoleate/Hydrogen Polysulfide System	
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Biol. Pharm. Bull	830-839
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1248/bpb.b23-00116	有
'	-
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-
1.著者名	4 . 巻
ー・有有有 Hiroyuki Mizuno, Chisato Kubota, Yuta Takigawa, Ryosuke Shintoku, Naokatsu Kannari, Takako	4 · 공 172
Muraoka, Hideru Obinata, Yuhei Yoshimoto, Masato Kanazawa, Ichiro Koshiishi, Seiji Torii	2
2.論文標題	5 . 発行年
2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl acts as a volatile inhibitor of ferroptosis and	2022年
neurological injury	
3. 雑誌名	6.最初と最後の頁
J. Biochem.	71-78
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1093/jb/mvac044	有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著
オープンデアと人としている(よた、その子をとめる)	-
1.著者名	4 . 巻
Ichiro Koshiishi, Yuta Takigawa	3
2.論文標題	5.発行年
Oxidative cleavage of polyunsaturated fatty acid chains via dioxygenation/oseudoperoxidation by 15-lipoxygenase	2021年
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Advances in Redox Research	100023
	*=-
掲載論文のD01 (デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1016/j.arres.2021.100023	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスとしている(また、その予定である)	-
1 . 著者名	4 . 巻
Seiya Nagai, Ichiro Koshiishi.	1163
2.論文標題	5.発行年
Simple and sensitive quantification of glutathione hydropersulfide alkylated using	2021年
iodoacetamide by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization.	
3 . 雑誌名	6.最初と最後の頁
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.	122516
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
10.1016/j.jchromb.2020.122516.	有
オープンアクセス	国際共著
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	-

1.著者名 Seiya Nagai, Masaki Yoshida, Yuta Takigawa, Seiji Torii , Ichiro Koshiishi.	4.巻 343
2.論文標題 Botanical sulfane sulfur donors inhibit ferroptotic cell death caused by the depletion of cysteine.	5 . 発行年 2021年
3.雑誌名 Food Chem.	6.最初と最後の頁 128511
掲載論文のDOI(デジタルオプジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2020.128511.	 査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著
1.著者名 Takigawa Y. Koshiishil.	4. 巻 68
2.論文標題 Catalytic production of oxo-fatty acids by lipoxygenases is mediated by the redical-radical dismutation between fatty acid alkoxyl radicals and fatty acid peroxyl radicals in fatty acid assembly.	5 . 発行年 2020年
3.雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6.最初と最後の頁 258-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著
[学会発表] 計16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件) 1.発表者名 相内彩伽、瀧川雄太、輿石一郎	
2 . 発表標題 核内受容体アゴニスト中共役ポリエン構造の異性化における多硫化水素の役割について	
3.学会等名 第60回北関東医学会総会	

第69回北関東医学会総会 4 . 発表年 2022年 1 . 発表者名 齊藤夏奈、永井聖也、輿石一郎 2 . 発表標題 がん患者特有の悪臭成分ジメチルトリスルフィドは抗がん剤誘導がん細胞死を阻害するか? 3 . 学会等名 第69回北関東医学会総会 4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 城田美穂、瀧川雄太、永井聖也、興石一郎 2 . 発表標題 がん組織に局在するバクテリアが産生する硫化水素は抗がん剤誘導がん細胞死を阻害するか? 3 . 学会等名 第69回北関東医学会総会 4 . 発表年
がん組織に局在するバクテリアが産生する硫化水素は抗がん剤誘導がん細胞死を阻害するか? 3.学会等名 第69回北関東医学会総会
第69回北関東医学会総会
│ 4 .発表年
2022年
1 . 発表者名 永井聖也、瀧川雄太、鳥居征司、輿石一郎
2 . 発表標題 化学療法における食品成分の影響について:フェロトーシスと含硫化合物
3 . 学会等名 第66回北関東医学会総会
4.発表年 2019年
1.発表者名 高田伊純、関根虎太郎、永井聖也、輿石一郎
2 . 発表標題 組織局所中結合型イオウの測定法の確立
3 . 学会等名 第66回北関東医学会総会
4 . 発表年 2019年
1.発表者名 瀧川雄太、冨澤賢太郎、輿石一郎
2.発表標題 リポキシゲナーゼによるPPARsアゴニスト「オキソ脂肪酸」の産生機序について
3 . 学会等名 第66回北関東医学会総会
4.発表年 2019年

1.発表者名 與石一郎、永井聖也、瀧川雄太	
2.発表標題 食品由来活性硫黄分子種の体内動態解析を目的とした分析法の開発	
3 . 学会等名 第8回食品薬学シンポジウム	
4 . 発表年 2019年	
1.発表者名 永井聖也、瀧川雄太、輿石一郎	
2 . 発表標題 フェロトーシス誘導細胞への食品由来サルフェン硫黄の影響評価	
3.学会等名 第8回食品薬学シンポジウム	
4 . 発表年 2019年	
1.発表者名 瀧川雄太、永井聖也、輿石一郎	
2 . 発表標題 野菜ジュース中多価不飽和脂肪酸由来PPARアゴニストの生成機序に関する研究	
3.学会等名 第8回食品薬学シンポジウム	
4 . 発表年 2019年	
1.発表者名 大崎修平、吉田雅基、瀧川雄太、輿石一郎	
2 . 発表標題 フェロトーシス誘導細胞内還元ストレスの定量的評価	
3.学会等名 第65回北関東医学会総会	
4 . 発表年 2018年	

1.発表者名 吉田雅基、瀧川雄太、輿石一郎
2 . 発表標題 多硫化水素によるフェロトーシス誘導細胞死阻害機構に関する研究
3.学会等名 第65回北関東医学会総会
4.発表年 2018年
•
1.発表者名 高田伊純、藤村祥太、永井聖也、輿石一郎
2.発表標題
2 . 先衣標題 血清アルプミン結合型イオウの細胞内同化機構に関する研究
3 . 学会等名 第65回北関東医学会総会
4.発表年 2018年
1.発表者名
藤村翔太、高田伊純、永井聖也、輿石一郎
2、 及主
2 . 発表標題 食品中結合型イオウは生体内で活性イオウ分子種として同化され得るか?
3 . 学会等名 第65回北関東医学会総会
4 . 発表年 2018年
1
1.発表者名 今井絢子、興石一郎
2.発表標題
肝コンドロイチン硫酸 / デルマタン硫酸による肝間葉系細胞老化の評価
3 . 学会等名 第65回北関東医学会総会
4 . 発表年 2018年

1.発表者名 瀧川雄太、輿石一郎	
2 . 発表標題 多硫化水素は脂質メディエーターを介する生理機能を撹乱するか?	
3 . 学会等名 第65回北関東医学会総会	
4 . 発表年 2018年	
1.発表者名 永井聖也、瀧川雄太、藤村翔太、吉田雅基、輿石一郎	
2 . 発表標題 細胞中グルタチオンポリスルフィド濃度の真値を簡便に測定する	
3.学会等名 第65回北関東医学会総会	
4 . 発表年 2018年	
〔図書〕 計0件	
〔産業財産権〕	
〔その他〕	
6.研究組織 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) 所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
7.科研費を使用して開催した国際研究集会	
〔国際研究集会〕 計0件	

相手方研究機関

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国